FLEX
Polyclonal Rabbit
Anti-S100
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS504

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Polyclonal Rabbit Anti-S100, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody labels cells expressing S100 and is useful for the identification of S100-positive neoplasms, such as malignant melanoma (1, 2), Langerhans' histiocytosis (3), chondroblastoma (4), and schwannoma (5). A panel of antibodies including Polyclonal Anti-S100, Code Z0311, has been applied by the International Lymphoma Study Group for the classification of tumors of suspected histiocytic/dendritic cell type (6). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and explanation

S100 is a multigene family of low molecular weight (Mr between 9 000 and 13 000) Ca^{2+}-binding proteins. The family comprises 19 members that are differentially expressed in a large number of cell types. Thus, S100B (previously S100□) is most abundant in glial cells of the central and peripheral nervous system, in melanocytes, chondrocytes, and adipocytes, whereas S100A1 (previously S100A/S100□) is most abundant in cardio-myocytes, slow twitch skeletal muscle cells, salivary epithelial cells, and renal cells. Additionally, S100B is found in tumor cells and subpopulations of neurons, while S100A1 has also been detected in hippocampal neurons. S100A6 is expressed by fibroblasts and smooth and heart muscle cells (5).

Members of the S100 family have been implicated in the Ca^{2+}-dependent regulation of a variety of intracellular activities, e.g. protein phosphorylation, cell proliferation (including neoplastic transformation), and differentiation (7).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use polyclonal rabbit antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Immunogen

S100 isolated from cow brain.

Specificity

The antibody has been solid-phase absorbed with human plasma and cow serum proteins.

In Western blotting of purified human recombinant S100 proteins, the antibody labels S100B strongly, S100A1 weakly, and S100A6 very weakly. No reaction was observed with the other S100 proteins tested, S100A2, S100A3 and S100A4 (8).

In indirect ELISA, the antibody shows no reaction with human plasma and cow serum.

As demonstrated by immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, the antibody cross-reacts with the S100 equivalent protein in man, cat, horse, mouse, rat, and swine.

Precautions

1. For professional users.

2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 ℃. Do not use after expiration date sta mped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004).

Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume)

Autoprogram: S100 (without counterstaining) or S100H (with counterstaining)

The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include colon and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Rabbit, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS600).

Staining interpretation

Cells labeled by the antibody display nuclear and cytoplasmic staining.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Performance characteristics

Normal tissues: Positive labeling with the antibody is observed in some Langerhans' cells and melanocytes of the skin, interdigitating reticulum cells in lymph nodes, medullary epithelial reticular cells in the thymus, chondrocytes in cartilagenous tissue, adipocytes in some, but not other biopsies, myoepithelial cells in salivary glands and breast, folliculostellate cells of the pituitary gland, and Schwann cells and glial cells of nervous tissue. Weak labeling is found in epithelial cells of the mammary and sweat glands. A negative reaction with the antibody is observed in normal hepatocytes, bile duct epithelium, gall bladder epithelium, oesophagus, stomach, and small and large intestinal epithelia, renal epithelia, and urothelial and endothelial cells (9). In colon, the satellite cells of the peripheral nerves in the plexus of Auerbach show a moderate to strong nuclear and cytoplasmic staining reaction, whereas adipocytes and ganglion cells in the plexus of Auerbach show a weak to moderate nuclear and cytoplasmic staining reaction.

Abnormal tissues: Of malignant melanomas, 31/31 (100%) conventional cutaneous, 23/24 (96%) metastatic, including 10 amelanotic, 6/6 desmoplastic, and 1/1 myxoid malignant melanomas were labeled by the antibody. In 30 benign and 15 dysplastic naevi, universal homogenous labeling was seen in all cases (1). In another study of primary malignant cutaneous melanomas (2), 67/67 (100%) were positive with the antibody, including 5/5 spindle cell and desmoplastic tumors. In 27 cases of Langerhans' histiocytosis, 88.5% were labeled by the antibody, this included localized as well as disseminated disease (3). Of 30 chondroblastomas examined, all demonstrated a strong labeling of the chondroblasts with the antibody (4). Of typical benign schwannomas, 12/12 were positive with the antibody, as also 2/4 malignant schwannomas. Of neurofibromas, 6/6 showed weak expression of S100, except for some isolated cells and a number of eel-like cell processes which were distinctively positive (5). Of note is that S100 was expressed by 15 of 133 non-melanocytic primary cutaneous neoplasms, i.e. 7/16 eccrine carcinomas, 2/8 metastatic visceral carcinomas, 2/2 malignant schwannomas, and 4/5 leiomyosarcomas (2). Of primary adenocarcinomas, 24/25 (84%) ovary, 12/15 (80%) salivary gland, 28/36 (78%) endometrium, 15/23 (65%) renal, 12/20 (60%) breast, 7/28 (25%) colon/rectum, 2/10 (20%) stomach, and 2/27 (7%) lung adenocarcinomas were positively labeled by the antibody. Adenocarcinomas of the oesophagus, gallbladder, pancreas and prostate were all negative in this study. Most of the primary neoplasms that expressed S100 were also positive for this protein in metastatic foci (10). Of rhabdomyosarcomas, 7/60 (12%) were labeled by the antibody. The S100-positive tumors were also positive for vimentin and desmin (11).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique *in vitro.*

FLEX Polyclonal Rabbit Anti-S100, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps marque les cellules exprimant la S100 et facilite l'identification des néoplasmes positifs à la S100, comme le mélanome malin (1, 2), l'histiocytose à cellules de Langerhans (3), le chondroblastome (4) et le schwannome (5). Un groupe d'anticorps comprenant l'anticorps Polyclonal Anti-S100 (Réf. Z0311), a été appliqué par l'International Lymphoma Study Group (groupe d'étude international des lymphomes) pour la classification des tumeurs soupçonnées d'être de type histiocytaire/dendritique (6). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication

S100 est une famille multigénique de protéines de liaison Ca^{2+} de faible poids moléculaire (Mr = entre 9000 et 13 000). La famille est composée de 19 membres à l'expression différentielle dans un grand nombre de types cellulaires. Par conséquent, la S100B (anciennement S100□) est plus abondante dans les cellules gliales du système nerveux central et périphérique, dans les mélanocytes, les chondrocytes et les adipocytes, tandis que la S100A1 (anciennement S100A/S100□) est plus abondante dans les cardiomyocytes, les cellules du muscle squelettique lent, les cellules épithéliales salivaires et les cellules rénales. De plus, la S100B est présente dans les cellules tumorales et les sous-populations de neurones, alors que la S100A1 a également été détectée dans les neurones de l'hippocampe. La S100A6 est exprimée par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses et cardiaques (5).

Les membres de la famille S100 ont été impliqués dans la régulation dépendant du Ca^{2+} de diverses activités intracellulaires, par exemple la phosphorylation des protéines, la prolifération cellulaire (y compris la transformation néoplasique), et la différenciation (7).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps polyclonal de lapin prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Immunogène

S100 isolée à partir de cerveau bovin.

Spécificité

L'anticorps a été absorbé en phase solide en utilisant des protéines de plasma humain et de sérum bovin.

Dans les analyses par Western blot de protéines humaines recombinantes S100, l'anticorps marque la S100B fortement, la S100A1 faiblement et la S100A6 très faiblement. Aucune réaction n'a été observée avec les autres protéines S100 testées, S100A2, S100A3 et S100A4 (8).

Lors d'un test ELISA indirect, l'anticorps ne présente aucune réaction avec le plasma humain et le sérum bovin.

Comme le démontre l'analyse immunohistochimique de coupes de tissu fixé au formol et inclus en paraffine, l'anticorps présente une réaction croisée avec la protéine homologue à la S100 chez l'homme, le chat, le cheval, la souris, le rat et le porc.

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.

3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.

5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 ℃. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004).

Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link, en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision(FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µL)

Autoprogram : S100 (sans contre-coloration) ou S100H (avec contre-coloration)

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec (10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela garantit des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide de EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre le côlon et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Rabbit, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS600).

Interprétation de la coloration

Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration cytoplasmique et nucléaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : Le marquage positif par l'anticorps est observé dans certaines cellules de Langerhans et certains mélanocytes de la peau, les cellules réticulaires interdigitées dans les ganglions lymphatiques, les cellules réticulaires épithéliales médullaires dans le thymus, les chondrocytes dans le tissu cartilagineux, les adipocytes dans certaines biopsies, les cellules myoépithéliales des glandes salivaires et du sein, les cellules folliculo-stellaires de l'hypophyse, ainsi que les cellules de Schwann et les cellules gliales du tissu nerveux. Une faible coloration est observée dans les cellules épithéliales des glandes mammaires et sudoripares. Une réaction négative à l'anticorps a été observée dans les hépatocytes normaux, l'épithélium du canal biliaire, l'épithélium de la vésicule biliaire, l'œsophage, l'estomac, ainsi que les épithéliums de l'intestin grêle et du gros intestin, les épithéliums rénaux et les cellules urothéliales et endothéliales (9). Dans le côlon, les cellules satellites des nerfs périphériques du plexus d'Auerbach présentent une coloration cytoplasmique et nucléaire modérée à forte, tandis que les adipocytes et les cellules ganglionnaires du plexus d'Auerbach présentent une coloration cytoplasmique et nucléaire faible à modérée.

Tissus tumoraux : Parmi les mélanomes malins, 31/31 (100 %) mélanomes malins cutanés classiques, 23/24 (96 %) mélanomes malins métastatiques, y compris 10 non mélaniques, 6/6 mélanomes malins desmoplastiques, et 1/1 mélanome malin myxoïde ont été marqués par l'anticorps. Sur 30 nævi bénins et 15 dysplasiques, une coloration universelle homogène a été observée dans tous les cas (1). Dans une autre étude portant sur des mélanomes malins cutanés primaires (2), 67/67 (100 %) étaient positifs à l'anticorps, dont 5/5 tumeurs à cellules fusiformes et desmoplastiques. Dans 27 cas d'histiocytose à cellules de Langerhans, 88,5 % étaient marquées par l'anticorps, y compris des maladies localisées ainsi que disséminées (3). Sur 30 chondroblastomes examinés, tous ont présenté une forte coloration des chondroblastes avec cet anticorps (4). Pour les schwannomes bénins classiques, 12/12 étaient positifs à l'anticorps, ainsi que 2 schwannomes malins sur 4. Pour les neurofibromes, 6/6 ont présenté une faible expression de la S100, excepté pour certaines cellules isolées et plusieurs processus à cellules filiformes qui étaient distinctement positifs (5). Il est à noter que la S100 était exprimée par 15 néoplasmes cutanés primaires non mélanocytaires sur 133, autrement dit 7/16 carcinomes eccrines, 2/8 carcinomes viscéraux métastasiques, 2/2 schwannomes malins et 4/5 léiomyosarcomes (2). Parmi les adénocarcinomes primaires, 24/25 (84 %) adénocarcinomes ovariens, 12/15 (80 %) adénocarcinomes des glandes salivaires, 28/36 (78 %) adénocarcinomes de l'endomètre, 15/23 (65 %) adénocarcinomes rénaux, 12/20 (60 %) adénocarcinomes mammaires, 7/28 (25 %) adénocarcinomes du côlon/rectum, 2/10 (20 %) adénocarcinomes de l'estomac et 2/27 (7 %) adénocarcinomes pulmonaires étaient marqués positivement par l'anticorps. Les adénocarcinomes de l'œsophage, de la vésicule biliaire, du pancréas et de la prostate étaient tous négatifs dans cette étude. La plupart des néoplasmes primaires qui exprimaient la S100 étaient également positifs à cette protéine dans les foyers métastasiques (10). Pour ce qui est des rhabdomyosarcomes, 7/60 (12 %) étaient marqués par l'anticorps. Les tumeurs positives à la S100 étaient également positives à la vimentine et à la desmine (11).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Polyclonal Rabbit Anti-S100, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper markiert Zellen, die S100 exprimieren, und dient zur Erkennung S100-positiver Neoplasmen, wie z. B. malignem Melanom (1, 2), Langerhans-Zell-Histiozytose (3), Chondroblastom (4) und Schwannom (5). Die International Lymphoma Study Group hat ein Antikörper-Panel, zu dem auch Polyclonal Anti-S100, Code-Nr. Z0311 gehört, zur Klassifizierung von Tumoren verdächtiger histiozytischer/dendritischer Zellen angewandt (6). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

S100 ist eine Multigenfamilie von Ca^{2+}-bindenden Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht (Mr: 9000–13.000). Die Familie umfasst 19 Mitglieder, die differenziell in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert werden. S100B (früher S100□) ist daher am häufigsten in Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in Melanozyten, Chondrozyten und Adipozyten anzutreffen, während S100A1 (früher S100A/S100□) am häufigsten in Kardiomyozyten, leicht zuckenden Skelettmuskelzellen, Speichel-Epithelzellen und Nierenzellen auftritt. Zusätzlich tritt S100B in Tumorzellen und Subpopulationen von Neuronen auf, während S100A1 auch in Hippocampus-Neuronen nachgewiesen wurde. S100A6 wird durch Fibroblasten sowie Zellen glatter Muskulatur und des Herzmuskels exprimiert (5).

Die Mitglieder der S100-Familie wurden mit der Ca^{2+}-abhängigen Regulierung zahlreicher intrazellulärer Vorgänge in Verbindung gebracht, z. B. der Protein-Phosphorylierung, der Zellproliferation (inkl. neoplastische Transformation) und der Differenzierung (7).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte

Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger polyklonaler Kaninchen-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Immunogen

Aus Rinderhirn isoliertes S100.

Spezifität

Der Antikörper wurde einer Festphasen-Absorption mit menschlichen Plasmaproteinen und mit Serumproteinen vom Rind unterzogen.

Beim Western-Blotting von gereinigten, menschlichen, rekombinanten S100-Proteinen markiert der Antikörper S100B stark, S100A1 schwach und S100A6 sehr schwach. Bei den anderen getesteten S100-Proteinen, S100A2, S100A3 und S100A4, wurde keine Reaktion beobachtet (8).

Beim indirekten ELISA-Verfahren zeigt der Antikörper keine Reaktion mit Humanplasma und Rinderserum.

Durch immunhistochemische Untersuchungen an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten wurde eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit dem S100-äquivalenten Protein von Mensch, Katze, Pferd, Maus, Ratte und Schwein nachgewiesen.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschch en aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) ist erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) erzielt werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Hinweis: Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Einbettmedium bedecken.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus)(Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µL Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram: S100 (ohne Gegenfärbung) oder S100H (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz"-Schritt auf „Pufferspülgang" eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz"-Schritt auf „Keine" einstellen. Dieses gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe muss Dickdarmzellen enthalten, und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene negative Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Rabbit (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS600).

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen eine nukleäre, zytoplasmatische Färbung auf.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: Positive Markierungen mit dem Antikörper werden in einigen Langerhans-Zellen und Melanozyten der Haut, interdigitierenden Retikulumzellen in Lymphknoten, medullären Retikulumepithelzellen im Thymus, Chondrozyten im Knorpelgewebe, Adipozyten in einigen, aber nicht allen Biopsien, Myoepithelzellen in den Speicheldrüsen und der Brust, Follikelzellen der Hypophyse sowie in Schwann-Zellen und Gliazellen des Nervengewebes beobachtet. Schwache Markierungen treten in Epithelzellen der Brust- und Schweißdrüsen auf. Eine negative Reaktion mit dem Antikörper wird in gesunden Hepatozyten, Gallengang- und Gallenblasen-Epithelien, in der Speiseröhre und im Magen, in kleinen und großen Darmepithelien, Nierenepithelien sowie in Urothel- und Endothelzellen beobachtet (9). Im Dickdarm zeigen die Satellitenzellen der peripheren Nerven im Auerbach-Plexus eine mäßige bis starke nukleäre und zytoplasmatische Färbereaktion, während Adipozyten und Ganglienzellen im Auerbach-Plexus eine schwache bis mäßige nukleäre und zytoplasmatische Färbereaktion zeigen.

Pathologisches Gewebe: Von den malignen Melanomen markierte der Antikörper 31 von 31 (100 %) konventionellen kutanen, 23 von 24 (96 %) metastatischen (darunter 10 amelanotische), 6 von 6 desmoplastischen und 1 von 1 myxoiden malignen Melanomen. In 30 benignen und 15 dysplastischen Naevi wurde in allen Fällen eine universale homogene Markierung beobachtet (1). In einer anderen Studie primärer, maligner, kutaner Melanome (2) reagierten 67 von 67 (100 %) positiv mit dem Antikörper, darunter 5 von 5 Spindelzellen und desmoplastischen Tumoren. In 27 Fällen von Langerhans-Zell-Histiozytose (lokalisiert oder verstreut) wurden 88,5 % durch den Antikörper markiert (3). Von 30 untersuchten Chondroblastomen zeigten alle eine starke Markierung der Chondroblasten mit dem Antikörper (4). Von typischen benignen Schwannomen reagierten 12 von 12 positiv mit dem Antikörper, ebenso 2 von 4 malignen Schwannomen. Von Neurofibromen zeigten 6 von 6 eine schwache Expression von S100, mit Ausnahme einiger isolierter Zellen und einiger aalähnlicher Zellprozesse, die deutlich positiv waren (5). Erwähnenswert ist, dass S100 von 15 von 133 nichtmelanozytischen, primären, kutanen Neoplasmen exprimiert wurde, und zwar von 7 von 16 ekkrinen Karzinomen, 2 von 8 metastatischen viszeralen Karzinomen, 2 von 2 malignen Schwannomen und 4 von 5 Leiomyosarkomen (2). Von den primären Adenokarzinomen wurden bei 24 von 25 (84 %) der Eierstockproben, 12 von 15 (80 %) der Speicheldrüsenproben, 28 von 36 (78 %) der Endometriumproben, 15 von 23 (65 %) der Nierenproben, 12 von 20 (60 %) der Brustproben, 7 von 28 (25 %) der Dickdarm-/Rektumproben, 2 von 10 (20 %) der Magenproben und 2 von 27 (7 %) der Lungenproben Adenokarzinome durch den Antikörper positiv markiert. Adenokarzinome von Speiseröhre, Gallenblase, Pankreas und Prostata waren in dieser Studie alle negativ. Die meisten der primären Neoplasmen, die S100 exprimierten, waren auch für dieses Protein in metastatischen Herden positiv (10). Von Rhabdomyosarkomen wurden 7 von 60 (12 %) durch den Antikörper markiert. Die S100-positiven Tumore waren auch für Vimentin und Desmin positiv (11).

References/ Références/ Literatur

1. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labeling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. Histochem J 2000; 32:475-81.
2. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. J Cutan Pathol 1988; 15:201-7.
3. Ye F, Huang S-W, Dong H-J. Histiocytosis X. S-100 protein, peanut agglutinin, and transmission electron microscopy study. Am J Clin Pathol 1990; 94:627-31.
4. Edel G, Ueda Y, Nakanishi J, Brinker KH, Roessner A, Blasius S, et al. Chondroblastoma in bone. A clinical, radiological, light and immunohistochemical study. Virchows Arch A Pathol Anat 1992; 421:355-66.
5. Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Schwechheimer K, Franke WW. The intermediate filament complement of the spectrum of nerve sheath neoplasms. Lab Invest 1986; 55:463-74.
6. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JKC, et al. (review). Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. Histopathology 2002; 41:1-29.
7. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). Biochim Biophys Acta 1999; 1450:191-231.
8. Ilg EC, Schäfer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. Int J Cancer 1996; 68:325-32.
9. Vanstapel M-J, Gatter KC, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Desmet VD. New sites of human S-100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. Am J Clin Pathol 1986; 85:160-8.
10. Herrera GA, Turbat-Herrera EA, Lott RL. S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinomas. Am J Clin Pathol 1988; 89:168-76.
11. Coindre J-M, de Mascarel A, Trojani M, de Mascarel I, Pages A. Immunohistochemical study of rhabdo-myosarcoma. Unexpected staining with S100 protein and cytokeratin. J Pathol 1988; 155:127-32.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF Catalogue number Référence catalogue Bestellnummer	2 °C – 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Σ Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller
Consult instructions for use Voir les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT Batch code Numéro de lot Chargenbezeichnung	

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17